

VALIDASI METODE ANALISIS β -KAROTEN DALAM EKSTRAK ETANOL 96% *Spirulina maxima* DENGAN SPEKTROFOTOMETRI VISIBEL

ANALYTICAL METHOD VALIDATION OF β -CAROTENE ON *Spirulina maxima* 96% ETHANOLIC EXTRACT WITH SPECTROPHOTOMETRY VISIBLE

Siti Fatmawati Fatimah*, Vani Aisyah, Laela Hayu Nurani,
Citra Ariyani Edityaningrum,

Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta

*Penulis korespondensi : fatmafatima28@gmail.com

ABSTRAK

Validasi metode analisis (VMA) penentuan kandungan β -karoten dalam *Spirulina maxima* perlu dilakukan agar didapatkan hasil yang valid dan dapat dipertanggung jawabkan secara ilmiah. Tujuan penelitian adalah membuktikan metode analisis penetapan kadar β -karoten dalam ekstrak etanol 96% *Spirulina maxima* menggunakan spektrofotometer visibel memenuhi syarat validitas. Parameter yang digunakan dalam VMA diantaranya spesifisitas, linieritas, akurasi, presisi, limit deteksi dan limit kuantitas. Syarat yang harus dipenuhi setiap parameter yaitu nilai korelasi (r) $\geq 0,98$ untuk linieritas, persen perolehan kembali masuk dalam range 98-102% dan nilai RSD $\leq 2\%$ untuk akurasi, nilai RSD $\leq 2\%$ untuk presisi, profil spektragram spektrofotometri visibel yang sama antara sampel dan standar untuk uji spesifisitas. Hasil penelitian dengan parameter validasi diantaranya linieritas dengan nilai $r=0,998$, persen perolehan kembali dalam rentang 98-101%, presisi keberulangan sistem dengan RSD 1,14 %, presisi antara 0,99 % dan uji spesifisitas sesuai profil spektragram spektrofotometri visibel yang sama antara sampel dan standar. Nilai LOD yang diperoleh yaitu 1,656 ug/mL dan LOQ 5,017 ug/mL. Berdasarkan hasil tersebut maka analisis penetapan kadar β -karoten dalam ekstrak etanol 96% *Spirulina maxima* dengan metode spektrofotometri visibel memenuhi syarat validitas menurut Petunjuk Operasional Penerapan CPOB tahun 2013.

Kata kunci : *Spirulina maxima*, β -karoten, validasi metode analisis, spektrofotometri visibel.

ABSTRACT

Analytical validation methods of β -carotene content determination on Spirulina maxima has to be done so that the obtained results are valid and can be accountable scientifically. The purpose of the research was to prove the validity of analytical method to determine the β -carotene content on 96% ethanol extract of Spirulina maxima using a spectrophotometer visible. The parameters were in linearity, specificity, accuracy, precision, limit of detection and limit of quantity. The requirement must be met, correlation (r) value ≥ 0.98 percent for linearity, range of percent recovery about 98-102%, accuracy value at $\leq 2\%$, precision value at $\leq 2\%$, same spectrogram profile between samples and standards to test the specificity. Research results were $r = 0.998$ for linearity, 98-101% for percent recovery range, precision value at 1.144%, intermediate precision at 0.987% and match spectrogram profile between samples and standards for specificity. LOD values obtained i.e. 1.656 $\mu\text{g/mL}$ and LOQ 5.017 $\mu\text{g/mL}$. Based on the results, the analytical method of β -carotene determination on Spirulina maxima 96% ethanol extract with spectrophotometry visible method were qualify base on Petunjuk Operasional Penerapan CPOB tahun 2013.

Keyword : *Spirulina maxima, β -carotene, validity of analytical method, spectrophotometry visible*

PENDAHULUAN

WHO melaporkan lebih dari tiga juta anak balita meninggal akibat malnutrisi tiap tahunnya dengan resiko 13 kali lebih besar dibandingkan anak yang normal. Akibat jangka panjang menyebabkan perkembangan mental dan pertumbuhan otak terganggu secara *irreversible*. Malnutrisi juga dapat terjadi akibat efek samping terapi pasien kanker yaitu penurunan nafsu makan, rasa mual dan muntah. *Food Drug Association* (FDA) mengakui malnutrisi dapat menggunakan Spirulina dengan kandungan β karoten yang tinggi (10 mg tiap 3 gram bubuk spirulina) serta vitamin A (Lorenz, 2002). β -karoten dalam *Spirulina maxima* dapat dikonversi menjadi vitamin A yang berfungsi untuk menjaga pertumbuhan jaringan epitel, mata, rambut dan tulang (Kamiensky dan Keogh, 2006). Berbagai macam manfaat β -karoten yang dapat ditemukan dalam *Spirulina maxima* sehingga perlu dilakukan analisis kandungan β -karoten dengan menggunakan metode yang tepat.

Metode analisis yang digunakan untuk menetapkan kadar β -karoten telah banyak dilakukan seperti KLT densitometri (Starek *et al.*, 2014) dan HPLC (Luterotti *et al.*, 2013) namun belum dilakukan pada sampel *Spirulina maxima*. Selain dengan menggunakan metode KLT densitometri dan HPLC, analisis senyawa β -karoten di dalam *Spirulina maxima* dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri visibel karena β -karoten memiliki gugus kromofor di dalam rumus strukturnya yang

merupakan syarat suatu senyawa dapat dianalisis dengan metode spektrofotometri visibel (Harmita, 2006).

Senyawa β -karoten di dalam *Spirulina maxima* dapat dianalisis dengan metode spektrofotometri visibel apabila metode tersebut telah dilakukan validasi metode analisis (VMA) dengan parameter spesifisitas, linieritas, akurasi, presisi, limit deteksi dan limit kuantitas. VMA senyawa β -karoten di dalam ekstrak etanol *Spirulina maxima* perlu dilakukan agar diperoleh metode analisis yang valid, akurat, tepat, cermat dan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah sehingga nantinya dapat digunakan untuk menetapkan kadar zat aktif β -karoten sebagai syarat untuk memperoleh bahan baku simplisia yang berkualitas, aman, dan berkhasiat secara farmakologis.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah timbangan neraca (AND GR 202), alat gelas, corong dan labu takar 5 dan 10 mL *class A* (Iwaki Pyrex), mikropipet 10-100 μ L dan 100-100 μ L (Socorex), kertas saring, alat vortek, *sentrifuge*, *rotary evaporator* (Büchi), corong, kuvet kuarsa (Hellma) dan instrumen spektrofotometer UV-1800 SHIMADZU. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah standar β -karoten (Calbiochem), aseton absolut pro analisis (Merck), etanol 96% (Brataco), ekstrak etanol 96% *Spirulina maxima*.

Jalannya Penelitian

Pembuatan Larutan Induk

Sepuluh miligram standar β -karoten ditimbang dan dipindahkan ke labu takar 10 mL. Aseton absolut pro analisis ditambahkan kedalam labu takar sampai batas 10 mL sehingga diperoleh kadar 0,994 mg/mL larutan (Biswas *et al*, 2011).

Pembuatan Kurva Baku

Enam seri kadar dari larutan induk seperti terlihat pada Tabel I diencerkan dengan pelarut aseton hingga tanda 5 mL kemudian dibaca serapannya dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang maksimal dan waktu yang sesuai dengan *operating time*. Kemudian ditentukan persamaan regresi liniernya (Octaviani *et al*, 2014).

Tabel I. Konsentrasi Kurva Baku β -karoten

Volume larutan induk (μ L)	70	80	90	100	110	120
Konsentrasi (μ g/mL)	13,916	15,904	17,892	19,880	21,868	23,856

Penentuan panjang gelombang serapan maksimum

Larutan induk dipipet sebanyak 100 μ L dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL dan ditambahkan pelarut aseton p.a sampai tanda 5 mL. Larutan dibaca serapannya pada panjang gelombang 350 – 550 nm. Panjang gelombang yang dipilih berdasarkan nilai absorbansi maksimal (Octaviani *et al*, 2014).

Penetapan *Operating Time*

Larutan induk dipipet sebanyak 100 μ L dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL dan ditambahkan pelarut aseton p.a sampai tanda 5 mL. Larutan dibaca serapannya pada λ maksimal, sampai diperoleh waktu serapan stabil (Octaviani *et al*, 2014).

Uji Kesesuaian Sistem

Larutan induk dipipet sebanyak 100 μ L dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL dan ditambahkan pelarutan aseton p.a sampai tanda 5 mL. Larutan dibaca serapannya sebanyak 6 kali berturut-turut dan dilihat % RSD (Bahera *et al*, 2012).

Penetapan Kadar β -Karoten pada Sampel (*Spirulina maxima*)

Ekstrak etanol 96% *Spirulina maxima* ditimbang 10 mg dimasukkan kedalam labu takar 10 mL dan ditambahkan aseton p.a sampai tanda. Larutan divortek 10 menit kemudian disentrifus 10 menit. Bagian supernatan diambil, disaring dengan kertas saring. Larutan dibaca pada λ maksimal dan sesuai *operating time*. Penetapan kadar dilakukan replikasi sebanyak 3 kali (Biswas *et al*, 2011).

Validasi Metode Analisis

Spesifisitas

Ekstrak etanol 96% *Spirulina maxima* ditimbang sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL dan ditambahkan aseton pro analisis sampai

tanda 10 mL. Larutan divortek selama 10 menit dan selanjutnya disentrifus selama 10 menit. Bagian supernatan diambil, disaring dengan kertas saring. Larutan dibaca serapannya pada λ maksimal. Spektra yang dihasilkan pada sampel dibandingkan dengan standar β -karoten (Anonim, 2013).

Linieritas

Linieritas ditentukan dengan dibuat enam seri kadar dari yang dilarutkan dalam labu takar 5 mL. Tiap larutan dibaca serapannya pada λ maksimal dan waktu sesuai dengan *operating time*. Kemudian dihitung nilai korelasi (r) (Anonim, 2013).

Akurasi

Seri larutan induk β -karoten seperti tersaji pada Tabel II ditambahkan ke dalam 10 mg ekstrak etanol 96% *Spirulina maxima*, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL. Ditambahkan aseton p.a sampai tanda. Larutan divortek 10 menit dan selanjutnya disentrifus 10 menit. Masing-masing larutan dibaca pada λ maksimal dan waktu yang sesuai dengan *operating time*, selanjutnya dihitung persen recovery dengan persamaan 1.

$$\text{Persen recovery} = \frac{C^F - C^A}{C^{*A}} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

C^F : Konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C^A : Konsentrasi sampel sebenarnya

C^{*A} : Konsentrasi analit yang ditambahkan

Tabel II. Seri larutan akurasi β -karoten

Seri larutan	Persentase yang ditambahkan (%)	Konsentrasi standar β -karoten yang ditambahkan ($\mu\text{g/mL}$)
1	40	6,518
2	30	4,889
3	20	3,259

Presisi

Presisi keberulangan sistem (*Repeatability*) dilakukan dengan dipipet 100 μL dari larutan induk dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL. Ditambahkan pelarut aseton p.a

sampai tanda. Dilakukan 6 kali pengulangan. Larutan dibaca serapannya dengan spektrofotometer visibel pada λ maksimal dan pada *operating time*.

Presisi antara dilakukan oleh 2 operator berbeda, namun menggunakan instrumen dan hari yang sama. Uji presisi antara dilakukan dengan cara memipet 100 μ L dari larutan induk, dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL dan ditambahkan pelarut aseton p.a sampai dengan 6 kali pengulangan. Larutan dibaca serapannya dengan spektrofotometer visibel pada λ maksimal dan pada *operating time*.

LOD (*Limit Of Detection*) dan LOQ (*Limit Of Quantification*)

LOD dan LOQ ditentukan dengan menggunakan data standar deviasi (σ) dan *slope* (b) dari kurva baku yang diperoleh dengan persamaan 2 dan 3.

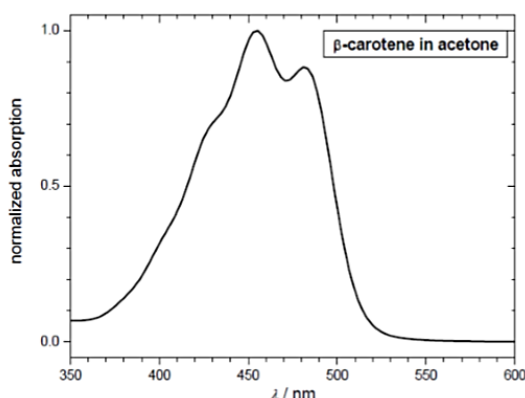
$$\text{LOD} = 3,3 \frac{\sigma}{S} \dots\dots\dots(2)$$

$$\text{LOD} = 10 \frac{\sigma}{S} \dots\dots\dots(3).$$

Keterangan: σ : Simpangan baku respon, S : *Slope* dari Kurva Kalibrasi

HASIL DAN PEMBAHASAN

Adanya ikatan ganda terkonjugasi dalam struktur β -karoten menandakan adanya gugus kromofor yang menyebabkan terbentuknya warna pada senyawa β -karoten (Sandmann, 1994). Selain itu, struktur β -karoten juga memiliki spektrum yang khas yakni antara 400-500 nm dengan dua puncak utama di sekitar 450 nm sesuai dengan pelarut yang digunakan dan biasanya ada dua puncak tambahan pada kedua sisi puncak utama seperti yang terlihat pada gambar 2 (Gao dan Kispert, 2003). Berdasarkan hal tersebut maka penetapan kadar senyawa β -karoten dapat dilakukan menggunakan metode spektrofotometri visible.



Gambar 2. Spektra serapan β -Karoten (Kopczynski *et al*,2007).

Upaya mengevaluasi suatu metode analisis, menjamin prosedur analisis, menjamin keakuratan dan mengurangi resiko penyimpangan yang mungkin timbul saat analisis β -karoten dalam sampel ekstrak etanol 96% *Spirulina maxima*, maka perlu dilakukan validasi metode dengan menggunakan instrumen spektrofotometer visible. Pada upaya ini dibagi menjadi 2 tahap yaitu prevalidasi dan pelaksanaan VMA.

Prevalidasi

Pembuatan Kurva Baku

Tujuan pembuatan kurva baku adalah mengetahui hubungan antara konsentrasi larutan dengan nilai absorbansinya. Kurva baku yang baik memiliki nilai linieritas $r \geq 0,98$ (Anonim, 2013). Nilai r yang memenuhi syarat menunjukkan bahwa dengan adanya perubahan kadar maka akan mempengaruhi nilai absorbansi secara linier. Berdasarkan Tabel III diperoleh persamaan regresi linier yaitu $y = 0,0299x - 0,0106$ dengan nilai $r = 0,993$. Berdasarkan hal tersebut maka hasil kurva baku tersebut dapat digunakan untuk penetapan kadar, uji akurasi, dan penentuan nilai LOD dan LOQ saat VMA.

Tabel III. Hasil pembacaan kurva baku standar β Karoten

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	13,916	15,904	17,892	19,880	21,868	23,856
Absorbansi	0,405	0,456	0,524	0,609	0,631	0,699

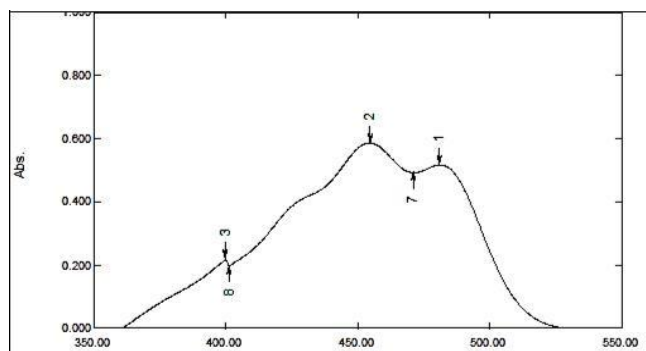
Penentuan Panjang Gelombang

Menurut Gandjar dan Rohman (2007), alasan penentuan panjang gelombang dilakukan yaitu pada panjang gelombang maksimal akan dihasilkan kepekaan yang maksimal, di sekitar panjang gelombang maksimal akan berlaku hukum Lambert-Beer dan jika dilakukan pengukuran ulang maka kemungkinan kesalahan yang terjadi kecil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimal dalam pembacaan absorbansi β -karoten yaitu 454 nm dengan profil memiliki 3 puncak yang merupakan ciri khas spektra β -karoten (Gambar 3). Panjang gelombang maksimal tersebut sesuai dengan penelitian Hiyama yang menyatakan panjang gelombang β -karoten dalam acetone sebesar 454 nm (Hiyama *et al*, 1969).

Penetapan *Operating Time*

Tujuan penentuan *operating time* adalah untuk mengetahui waktu pembacaan serapan β -karoten yang stabil. Absorbansi yang stabil dihasilkan pada menit 3 sampai

menit ke 30, sehingga *operating time* yang tepat dalam pelaksanaan VMA adalah 3-30 menit.



Gambar 3. Hasil pembacaan spectra β -karoten

Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk mengetahui bahwa alat spektrofotometer visibel yang digunakan dapat berfungsi dengan baik saat digunakan untuk penetapan kadar. Uji tersebut dapat diterima apabila dalam pembacaan absorbansi secara berulang sebanyak 6 kali diperoleh $RSD \leq 2\%$ (Bahera *et al*, 2012). Berdasar tabel IV, nilai RSD uji kesesuaian sistem adalah 0,82%. Hasil tersebut menunjukkan alat spektrofotometer visibel yang digunakan untuk analisis memiliki sistem yang stabil dalam pembacaan absorbansinya sehingga dapat digunakan dalam VMA β -karoten dalam ekstrak etanol 96% *Spirulina maxima*.

Tabel IV. Uji kesesuaian sistem spektrofotometer visible

Pengujian ke-	1	2	3	4	5	6
Absorbansi	0,618	0,606	0,607	0,614	0,609	0,605
Rata-rata \pm RSD	0,61 \pm 0,82%					

Penentuan kadar

Hasil penentuan kadar β -karoten pada ekstrak etanol 96% *Spirulina maxima* digunakan untuk menentukan nilai persen perolehan kembali atau *recovery* pada uji akurasi. Berdasar penelitian Thomas (2010), *Spirulina maxima* memiliki kandungan β -karoten pada rentang 150-250 mg dalam 100 gramnya. Hasil penentuan kadar berasal dari nilai absorbansi sampel yang terlihat pada Tabel V, yang dihitung sesuai dengan persamaan kurva baku $y = 0,0299x - 0,0106$. Berdasarkan persamaan tersebut diperoleh

kadar rata-rata β - karoten dalam ekstrak ethanol 96% *Spirulina maxima* sebanyak 162,963 mg dalam 100 gram ekstrak.

Tabel V. Penetapan kadar β -karoten ekstrak etanol 96% *Spirulina maxima*

Absorbansi	0,474	0,475	0,481
Kadar β -karoten dalam sampel (mg/100 gram)	162,070	162,410	164,410
Rata-rata \pm RSD	162,963 \pm 0,885 %		

Validasi Metode Analisis

Berdasarkan Petunjuk Operasional Penerapan CPOB tahun 2013, parameter yang dapat digunakan untuk melihat kevalidan suatu metode analisis diantaranya spesifisitas, linieritas, akurasi, presisi, LOD (*Limit Of Detection*) dan LOQ (*Limit Of Quantitation*).

Spesifisitas

Spesifitas merupakan kemampuan metode analisis untuk menguji secara tepat suatu analit dengan adanya komponen lain (Anonim 2014). Melalui λ maksimal 454 nm terdapat respon positif adanya senyawa β - karoten pada larutan standard dan larutan sampel yang di dalamnya terdapat komponen senyawa lain sehingga dapat digunakan untuk penetapan kadar β - karoten pada sampel.

Linieritas

Uji linieritas dilakukan untuk melihat absorbansi yang terukur, sebanding terhadap kadar senyawa uji secara linier (Anonim, 2013). Semakin linier maka kinerja metode yang digunakan untuk rentang konsentrasi yang diukur dalam kondisi sangat baik. Sama halnya dengan penentuan kurva baku, nilai uji linieritas yang diharapkan adalah $r \geq 0,98$ (Anonim, 2013), dengan menggunakan 6 tingkat konsentrasi yang berbeda kemudian dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimal 454 nm. Berdasar tabel VI, persamaan regresi linier yang dihasilkan yaitu $y = 0,031x - 0,0345$ dengan nilai $r = 0,998$.

Tabel VI. Linieritas standard β -karoten

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	13,916	15,904	17,892	19,880	21,868	23,856
Absorbansi	0,407	0,450	0,512	0,587	0,648	0,705

Akurasi

Tabel VII. Akurasi penetapan kadar β -carotene

Absorbansi	C ^F ($\mu\text{g/mL}$)	C ^A ($\mu\text{g/mL}$)	C ^{*A} ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	RSD (%)
0,674	22,890			101,154	
0,674	22,890	16,296	6,518	101,154	0,292
0,675	22,923			101,667	
0,623	21,184			99,983	
0,624	21,217	16,296	4,889	100,667	0,683
0,622	21,151			99,298	
0,573	19,512			98,665	
0,574	19,545	16,296	3,259	99,692	1,027
0,575	19,579			100,718	

C^F : Kadar β - karoten sampel + standarC^A : Kadar β - karoten dalam sampelC^{*A} : Konsentrasi Standar yang ditambahkan

dilakukan dengan metode yang sama secara berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek (Riyanto, 2014). Presisi antara dilakukan Akurasi menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Uji tersebut dilakukan dengan penambahan sejumlah konsentrasi standar β -karoten kedalam sampel ekstrak etanol 96% *Spirulina maxima* yang telah diketahui kadarnya (Tabel VII). Persen perolehan kembali yang diharapkan adalah 98-102 % dan nilai RSDnya $\leq 2\%$ (Anonim, 2013). Tabel VII menunjukkan nilai *recovery* berada pada rentang 98-101 % dan nilai RSDnya $\leq 2\%$. Hal tersebut berarti terdapat derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya.

Presisi

Rohman (2014) menyatakan pengujian presisi dilakukan untuk menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil yang diukur di bawah kondisi yang ditentukan. Semakin presisi metode analisis, maka simpangan baku (RSD) yang diperoleh semakin kecil.

Nilai simpangan baku yang diharapkan adalah $\leq 2\%$. Presisi dapat dinyatakan sebagai *repeatability* (keterulangan) dan *ruggedness* (presisi antara). Presisi keterulangan untuk melihat dampak keragaman dalam laboratorium sehingga dilakukan pada hari atau analisis atau peralatan yang berbeda namun pada laboratorium yang sama (Anonim, 2014).

Tabel VIII. Hasil uji ripitabilitas

Pengujian ke-	1	2	3	4	5	6
Absorbansi	0,612	0,612	0,605	0,617	0,620	0,603
Rata-rata \pm RSD	0,612 \pm 1,079 %					

Presisi keberulangan sistem dilakukan dengan membuat 6 larutan dengan konsentrasi yang sama dan kemudian dilakukan pembacaan absorbansi seperti pada tabel VIII. RSD 1,144% menunjukkan metode spektrofotometri visible memiliki keseragaman nilai yang tinggi.

Tabel IX. Hasil uji presisi antara

Pengujian ke-	Absorbansi operator A	Absorbansi operator B
1	0,610	0,612
2	0,612	0,600
3	0,609	0,623
4	0,608	0,602
5	0,612	0,602
6	0,602	0,608
X\pmRSD	0,608 \pm 0,987%	

Presisi antara dilakukan pada hari dan alat yang sama, namun dengan operator yang berbeda dengan hasil pada Tabel IX. RSD 0,987% menunjukkan metode yang digunakan dalam kondisi valid karena keseragaman data yang dihasilkan tinggi meskipun terdapat keragaman kondisi laboratorium.

LOD (*Limit of Detection*)

LOD merupakan konsentrasi terendah dalam analit yang dapat dideteksi namun tidak perlu terkuantisasi di bawah kondisi pengujian yang disepakati (Kantastubrata, 2008). LOD dapat berfungsi sebagai parameter untuk melihat sensitivitas suatu metode analisis (Gandjar dan Rohman, 2007). Nilai LOD dapat dihitung dari persamaan regresi

linier kurva baku $y = 0,0299x - 0,0106$ dengan simpangan baku (σ) 0,015 dan *slope* (s) 0,0299. Berdasarkan data tersebut, diperoleh LOD 1,656 ug/mL yang berarti bahwa konsentrasi tersebut merupakan konsentarsi terendah β -karoten yang dapat diperoleh tanpa terkuanntitas secara tepat.

LOQ (*Limit of Quantitation*)

LOQ merupakan nilai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih memenuhi kriteria cermat (Riyanto, 2014). Seperti nilai LOD, nilai LOQ dapat dihitung dari persamaan regresi linier kurva baku $y = 0,0299x - 0,0106$ dengan simpangan baku (σ) 0,015 dan *slope* (s) 0,0299. Berdasarkan data tersebut diperoleh batas kuantitas sebesar 5,017 ug/mL yang berarti bahwa konsentrasi terendah β -karoten yang dapat diperoleh dengan terkuanntitas secara tepat adalah 5,017 ug/mL.

KESIMPULAN

Hasil parameter validasi metode analisis yang telah dilakukan yaitu uji spesifisitas memenuhi syarat, uji linieritas dengan harga $r=0,998$, presisi keberulangan sistem $RSD=1,144\%$ dan presisi antara $RSD=0,987\%$, akurasi persen perolehan kembali pada rentang 98-101 %, LOD dengan hasil 1,656 ug/mL dan LOQ dengan hasil 5,017 ug/mL. Berdasarkan Petunjuk Operasional Penerapan CPOB tahun 2013, analisis β karoten dalam ekstrak etanol 96% *Spirulina maxima* dengan spektrofotometri visibel memenuhi syarat validitas.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2013, *Petunjuk Operasional Penerapan CPOB*, 603-623, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Anonim, 2014, *Farmakope Indonesia Edisi V*, Departemen Kesehatan RA: Jakarta
- Bahera, S., Ghanty, S., Ahmad, F., Santra, S., Banerjee, S., 2012, UV-Visible Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Paracetamol Tablet Formulation, *Analytical & Bioanalytical Techniques*, 3(6): 1-6
- Biswas, A.K., Chalti, M.K., Sahoo, J., 2011, A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination β -carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets, *Elsevier Food Science and Technology*, 44: 1809-1811
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, 245-255, Pustaka Pelajar, Yogyakarta

- Gao, Y., dan Kispert, L.D., 2003, Reaction of carotenoids and ferric chloride: equilibria, isomerization, and products, *J. Phys Chem*, 107: 5333 – 5338
- Harmita, 2006, *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*, 31-35, Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok
- Hiyama, T., Nishimura, M., Chance, B., 1969, Determination of carotenes by thinlayer chromatography, *Biochem*, 29: 339-342
- Kamiensky, M., dan Keogh, J., 2006, *Vitamin and Minerals*, 137-140, Mc.GrawHill Companies Inc, US
- Kantasubrata, J., 2008, Validation Metode, 117-135, Pusat Penelitian LIPI, Bandung
- Kopczynski, M., Ehlers, F., Lenzer, F., Oum, K., 2007, Evidence for an intramolecular charge transfer state in 12'-apo-beta-caroten-12'-al and 8'-apo-beta-caroten-8'-al: Influence of solvent polarity and temperature, *J. Phys. Chem*, 111: 5370-5381
- Lorenz, R., T., 2002, *Spirulina Microalgae*, Cyanotech Corporation: USA.
- Luterotti, S., Markovic, K., Franko, M., Bicanic, D., Madzgalj, A., 2013, Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of carotenoids in foods, *Elsevier*, 140 : 390-396
- Octaviani, T., Guntarti, A., Susanti, H., 2014, Penetapan Kadar β -Karoten pada Beberapa Jenis Cabe (Genus Capsicum) dengan Metode Spektrofotometri Tampak, *Pharmaciana*, 4(2): 101-108
- Riyanto, 2014, Validation dan verifikasi metode uji sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi, 21-71, Deepublish, Yogyakarta
- Rohman, A., 2014, *Validasi dan Penjaminan Mutu Metode Analisis Kimia*, 96-107, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
- Sandmann, G., 1994, Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants, *Eur J Biochem*, 1994: 978
- Starek, M., Guja, A., Dabrowska, M., Krzek, J., 2014, Assay of β -Carotene in Dietary Supplement and Fruit Juices by TLC-Densitometry, *Springer*, 8 : 1347-1353
- Thomas, S.S., 2010. *The role of parry organic spirulina in health management*, 23, Parry Nutraceuticals, Division of EID Parry (India) Ltd, India